

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Valentina Čabula
6699/BT

NOVA METODA DETEKCIJE SULFITA ZA PRIMJENU U
PAPIRNATOJ MIKROFLUIDICI

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Nova metoda detekcije sulfita za primjenu u papirnatost mikrofluidici

Valentina Čabula, 0058203074

Sažetak: U radu je po prvi puta na papirnatost mikrofluidičkoj platformi iskušana biamperometrijska detekcija analita, pri čemu je mikrofluidička platforma posebno prilagođena mjerenju u uvjetima konstantnog protoka elektrolita. Kao modelni analit odabran je sulfit, kao relativno čest alergen, ali i prototip nizu analita koji se mogu prevesti u plinovito stanje (npr. $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, $\text{S}^{2-}/\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}...$) i difuzijom izdvojiti iz kompleksne matrice uzorka te zbog toga vrlo selektivno detektirati i kvantificirati. Na temelju rezultata dobivenih testiranjem konstruiranog papirnato mikrofluidičkog senzora postavljene su smjernice za daljnji razvoj i usavršavanje testirane mikrofluidičke platforme. Zaključeno je da je u daljnjem razvoju senzora potrebno riješiti probleme vezane uz promjenjivu osnovnu struju i poboljšati reproducibilnost mjerenja unaprjeđivanjem dizajna senzora i omogućavanjem provedbe mjerenja metodom standardnog dodatka.

Ključne riječi: mikrofluidika na papiru, plinska difuzija, senzor, sulfit

Rad sadrži: 24 stranice, 10 slika, 16 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Datum obrane: 3. rujan 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study of Biotechnology

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for general and inorganic chemistry and electroanalysis

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

New sulphite detection method for use in paper microfluidics
Valentina Čabula, 0058203074

Abstract: For the first time biamperometric analytical detection was tested in the paper microfluidic platform, which is specifically adapted for measurement under conditions of constant electrolyte flow. As a model analyte are selected sulphides, as a relatively common allergen, but also as a prototype series of volatile analytes that can be converted into gas (ex. $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, $\text{S}^{2-}/\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}\dots$), diffuse and separate from the complex sample matrix and therefore highly selectively be detected and quantified. Based on the results obtained by testing the constructed paper microfluidic sensor, guidelines for further development and improvement of the tested microfluidic platform were laid down. It was concluded that in the further development of the sensor, problems related to variable primary current need to be solved and reproducibility of measurements improved by enhancing the design of the sensor and enabling the measurement to be carried out using the standard plug-in method.

Keywords: gas diffusion, paper-based microfluidic, sensor, sulphite

Thesis contains: 24 pages, 10 figures, 16 reference

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Supervisor: Izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Defence date: 3. rujan 2018.

Sadržaj

Uvod	1
1. Teorijski uvod	2
1.1. Povijest papirnatih senzora	2
1.2. Papir	2
1.3. Protok fluida kroz papir	4
1.3.1. Klasični i alternativni modeli protoka fluida kroz papir	4
1.4. 2-D i 3-D protok fluida kroz papir	6
1.5. Izrada hidrofobnih zona na papiru	7
1.6. Metode detekcije signala na papirnatom senzoru	8
1.7. Primjeri izvedbe papirnatih mikrofluidičkih senzora	12
2. Materijali i metode	14
2.1. Materijali	14
2.2. Instrumentacija	14
2.3. Metode	14
2.3.1. Dizajn i izrada papirnatih mikrofluidičkih platformi	14
2.3.2. Izvedba mjerenja	15
3. Rezultati i rasprava	16
3.1. Dizajn i princip rada mikrofluidičkog senzora	16
3.2. Testiranje mikrofluidičkog senzora	18
4. Zaključak	22
5. Literatura	23

UVOD

Kemijski senzori su male i jednostavne naprave koje omogućuju brzu i selektivnu detekciju i određivanje malih koncentracija analita prisutnih u kompleksnim uzorcima. Iako je još donedavno glavina komercijalne primjene kemijskih senzora bila ograničena na područje biomedicine, odn. kliničke biokemijske dijagnostike, u posljednjih desetak godina područje primjene kemijskih senzora ubrzano se širi i na druga područja. U području biotehnologije, kemijski senzori sve se češće primijenjuju za on-line praćenje biotehnoloških procesa, posebice za kontinuirano praćenje koncentracije nutrijenata u bioreaktorima. Afinitetni biosenzori, specifična podvrsta kemijskih senzora koja kao element za selektivno prepoznavanje analita koristi antitijela, sve veću primjenu pronalaze u medicinskoj i molekularnoj biotehnologiji.

U novije vrijeme značajni istraživački naponi ulažu se u razvoj integriranih analitičkih sustava koji kao podlogu koriste papir, a čiji se funkcionalni elementi izrađuju tehnikama tiska ("printanjem"). Kod takvih sustava prijenos uzorka i reagensa ostvaruje se mikrofluidičkim putem pomoću kanala otisnutih na papiru, a detekcija i kvantifikacija analita u uzorku obavlja se pomoću kemijskog senzora integriranog na papirnatu podlogu i također izrađenog tehnikama tiska. Takvi sustavi poznati su pod nazivom *mikrofluidičke papirnat* *analitičke platforme*, ili jednostavnije, *mikrofluidički papirnat* *senzori*. U odnosu na klasične kemijske senzore, prednost im je jednostavnost uporabe, izuzetno mala potrošnja uzorka i reagensa, ekološka prihvatljivost te vrlo niska cijena i mogućnost masovne proizvodnje jednostavnim i jeftinim tehnikama tiska. To ih čini idealnima za brze, rutinske ili terenske analize i hitnu kliničku dijagnostiku te otvara put masovnoj proizvodnji jeftinih senzora za široku uporabu, predviđenih za jednokratno korištenje, koji se nakon mjerenja mogu baciti bez opasnosti za okoliš.

U ovom je radu po prvi puta na papirnatj mikrofluidičkoj platformi iskušana biamperometrijska detekcija analita, pri čemu je mikrofluidička platforma posebno prilagođena mjerenju u uvjetima konstantnog protoka elektrolita. Kao modelni analit odabran je sulfid, kao relativno čest alergen, ali i prototip niza analita koji se mogu prevesti u plinovito stanje (npr. $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, $\text{S}^{2-}/\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}...$) i difuzijom izdvojiti iz kompleksne matrice uzorka te zbog toga vrlo selektivno detektirati i kvantificirati. Na temelju rezultata dobivenih testiranjem konstruiranog papirnatoj mikrofluidičkog senzora postavljene su smjernice za daljnji razvoj i usavršavanje testirane mikrofluidičke platforme.

1. Teorijski uvod

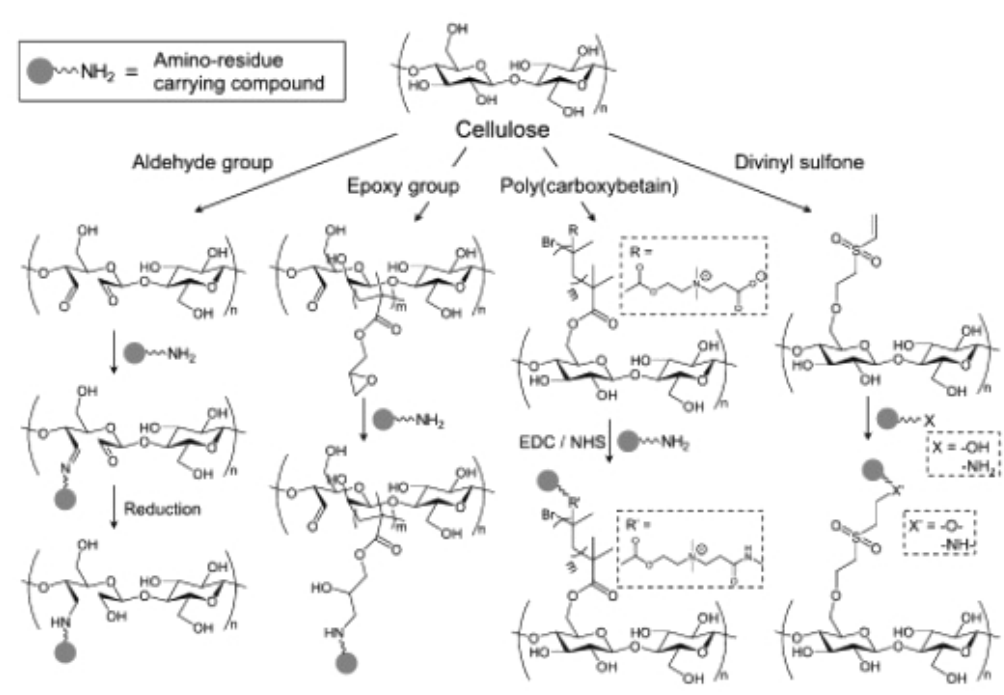
1.1. Povijest papirnatih senzora

Papir je i u povijesti imao primjenu u analitičkoj kemiji. Prva zabilježena primjena papira je bila kao lakmus papir za određivanje kiselosti i bazičnosti otopine [1]. Iako je ovo prva zabilježena primjena, zanimljiva je činjenica da je usavršavanjem lakmus papira razvijen cijeli niz različitih papirnatih indikatora za određivanje pH koji su i dan danas najrasprostranjenija metoda za određivanje pH. Lakmus papir nam pokazuje same principe i razloge koji stoje iza razvoja mikrofluidičkog papirnatog biosenzora i sličnih platformi. Iako postoje brojne metode za određivanje pH, često iziskuju skupu laboratorijsku opremu, uređaje i reagense, čije je odlaganje upitno za sigurnost okoliša, a i samo provođenje analiza je kompleksnije i zahtjeva predznanje ispitivača. Na taj način ove metode postaju poprilično nedostupne u nerazvijenim zemljama, čime je i poprilično ograničen njihov daljnji razvoj. Lakmus papir osim što je izrađen od vrlo rasprostranjene sirovine te je njegova izrada omogućena posvuda, ne zahtjeva primjenu drugih vanjskih uređaja, a analiza se temelji na kapanju uzorka i kolorimetrijskoj detekciji kiselosti ili bazičnosti. Zbog svoje jednostavnosti i niske cijene, lakmus papir je i dan danas svakodnevna metoda u brojnim laboratorijima, a možemo reći i suvremena metoda jer prkosi vremenu. Nakon lakmus papira, uslijedio je razvoj i brojnih drugih papirnatih senzora u obliku trakica za urin koje su omogućile detekciju albumina, šećera, kiselosti, a najvažniji od svih je poznatiji kao test za trudnoću koji omogućuje detekciju humanog korionskog gonadotropina (hCG) [1]. Svi ovi testovi su ušli u široku primjenu u javnom zdravstvu, a sam test za trudnoću je često i prvi način na koji buduće majke saznaju za trudnoću, što nam govori o njenoj rasprostranjenosti. Uslijedilo je zatišje u razvoju ovakvih uređaja, ali u novije vrijeme se sve više ulaže u istraživanja i razvoj kako bi revolucionarnim otkrićima unaprijedili razvoj gospodarstva, životnog standarda i dijagnostike.

1.2. Papir

Primarna uloga papira u izradi mikrofluidičkog papirnatog senzora je da on osigurava matriks senzora, odnosno inertnu poroznu podlogu kroz koju dolazi do spontanog protoka tekućine zbog kapilarnih sila te se na taj način osigurava transport tekućine, odnosno uzorka i reagensa. Ovo svojstvo papira proizlazi od njegove kemijske strukture. Papir se sastoji od celuloze, najrasprostranjenijeg biopolimera u prirodi, koji je sastavljen od D-glukoznih jedinica [1]. D-glukozne jedinice povezane su β -1,4-glikozidnim vezama u lance čime se

ostvaruje vlaknasta struktura koja pogoduje stvaranju poroznog matriksa i efektom tj. fenomenom ostvarivanja protoka fluida [1]. Najveći prirodni izvor celuloze su drvo i pamuk, koji se ujedno koriste kao sirovine za proizvodnju papira [2]. Drvo osim celuloze sadrži hemicelulozu, lignin i ostale spojeve koji se prilikom procesa proizvodnje papira uklanjaju, međutim potpuno uklanjanje ovih spojeva je gotovo nemoguće [1,2]. Iz tog razloga se za proizvodnju papira kod kojega je kemijska čistoća posebice važan kriterij, kao sirovina koristi se pamuk koji sadrži glavninu celuloze i vrlo male količine ostalih spojeva [1-3]. Proces proizvodnje papira kao produkt daje tanke listove koji se sastoje od mreže nasumično isprepletenih vlakana pri čemu dolazi do formiranja pora [1-3]. Osim poroznosti papira, valja istaknuti i hirofilnost koja kao kemijsko svojstvo papira proizlazi od mnoštva hidroksilnih skupina koje sadrži celuloza kao polisaharid [1,3]. Pri obradi sirovina u procesu proizvodnje papira koriste se različite kemikalije, ali i aditivi koji služe za poboljšanje nekih od željenih svojstva papira i funkcionalnosti konačnog proizvoda [1-3]. Kemikalije i aditivi mogu imati potencijalno štetan utjecaj na rad senzora zbog čega se kao glavni odabir za izradu papirnatih senzora koristi filter papir [1-3]. Osim što se za dobivanje filter papira kao sirovina koristi pamuk te je udio nečistoća minimalan, on ne sadrži zaostale kemikalije niti aditive koji bi mogli utjecati na relevantnost samih mjerenja. Mikroporozna priroda papira rezultira velikim omjerom površine i volumena što je vrlo važan fizikalni parametar, koji ujedno i omogućuje imobilizaciju različitih reagensa, ovisno o potrebama mjerenja koja se žele provesti [1,3].



Slika 1. Kemijska struktura celuloze i potencijalna aktivacija hidroksilnih grupa, preuzeto iz [1,3]

1.3. Protok fluida kroz papir

Protok fluida ostvaruje se bez upotrebe vanjske pumpe, čime se ostvaruju znatne uštede u vidu same početne investicije, ali i uštede tijekom provođenja mjerenja. Ovo je udjedno i jedna od najvažnijih prednost papirnatih senzora. Nakon što tekućinu nanesimo na površinu papira, ona se djelovanjem pasivnog procesa kapilarnosti počinje širiti po površini papira u svim smjerovima ravnomjerno. Glavni mehanizam koji omogućuje ostvarivanje protoka tekućine, odnosno fluida kroz papir je pojava kapilarnosti, odnosno sila kohezije i adhezije [4]. Kohezijske sile, u koje ubrajamo i površinsku napetost, javljaju se između molekula fluida te djeluju karakteristično na dodirnoj površii fluida i zraka [4,5]. Sile adhezije, kao što su primjerice Van der Waalsove interakcije, često diktiraju stupanj močenja papira [4,5]. Hidrofilna površina vlakana koja čine okosnicu strukture papira, omogućuje prijanjanje i širenje tekućine po poroznoj površini papira adhezijom [4,5]. Prilikom močenja papira sile adhezije su veće od sila kohezije, a protok ostvaren pojavom kapilarnosti je neprekidan zbog pojave razlike tlaka između vlažnog dijela papira i suhog dijela papira koji se nalazi ispred fronte tekućine ili fluida koji se po njemu širi [4,5].

1.3.1. Klasični i alternativni modeli protoka fluida kroz papir

Proces transporta fluida opisan je klasičnim i alternativnim modelima, koji uzimaju u obzir pojedine čimbenike kao što su isparavanje fluida, geometrijski oblik i karakteristike papira prilikom močenja [5]. U klasične modele ubrajamo dva izraza. Lucas- Washburnov izraz koji opisuje kapilarni protok u paralelno postavljanim cijevčicama – kapilarama te je prilagođen transportu fluida kroz porozni medij tj. papir i glasi:

$$l(t) = \sqrt{\frac{\gamma r \cos \vartheta}{2\mu}} t$$

gdje je $l(t)$ – duljina fronte, odnosno puta koji fluid prođe kapilarnim protokom, γ – površinska napetost, r – efektivan promjer pora papira, ϑ – kontaktni kut između fluida i vlakna papira, μ – viskoznost fluida, t – vrijeme. Izraz se odnosi na neograničen volumen fluida u uvjetima u kojima je sam poprečni presjek fluida konstantan, veličina pora jednaka te nema prisutnih nečistoća. Integriranje hidrofobnih barijera od voska je moguće jer one neće imati nikakvog utjecaja na močenje papira i transport fluida kroz papir. Ukoliko samo jedan od čimbenika nije u skladu s navedenim može doći do značajnih odstupanja analitičkih i eksperimentalnih rezultata [4,5].

Darcyjev zakon služi za samu karakterizaciju protoka fluida kroz papir te glasi:

$$Q = -\frac{\kappa WH}{\mu L} \Delta p$$

gdje je Q – volumni protok fluida, κ – propusnost (permeabilnost) papira, WH – je površina područja poprečnog presjeka koja je okomita na smjer strujanja fluida, μ – viskoznost fluida, L – duljina papira, Δp – razlika tlaka koja se javlja uzduž cjelokupne dužine papira. Glavni nedostatak klasičnih modela je taj što ne uzimaju u obzir neke od faktora koji bitno utječu na protok i transport fluida kroz papir kao što su isparavanje fluida, geometrijski oblik i karakteristike papira prilikom močenja. To je ujedno i glavni razlog za razvoj brojnih alternativnih modela. Većina mjerenja koja se provode na papirnatim senzorima odvijaju se pri sobnim uvjetima, kod kojih je isparavanje fluida kritično i uvelike utječe na transport kroz porozni papirni matriks [4,5].

Jedan od razvijenih alternativnih modela koji uključuje i efekt isparavanja fluida glasi:

$$l(t) = \sqrt{\frac{\gamma r \phi h \cos \vartheta}{4 \mu q} (1 - e^{\frac{-2q}{\phi h t}})}$$

gdje je $l(t)$ – duljina namočene površine papira, γ – površinska napetost, r – efektivan radijus pora papira, ϕ – poroznost papira, h – debljina papira, ϑ – kontaktni kut između fluida i vlakna papira, μ – viskoznost fluida, q – faktor isparavanja, t – vrijeme [5].

Također, razvijen je i alternativni model za upijanje i močenje proizvoljno oblikovanog papira, koji omogućuje predviđanje vremena potrebnog da se određena površina papira namoči ovisno o poprečnom presjeku papira. Zakonitost vrijedi u području u kojemu je sila gravitacije zanemariva te kod Stokesovog režima strujanja fluida ($Re \ll 1$). Izraz glasi:

$$\frac{\kappa R}{\mu} \int_0^1 A(l') dl' + \int_0^1 \left[A(l') \int_0^1 \frac{dx}{A(x)} \right] dl' = Dt$$

gdje je κ – propusnost (permeabilnost) papira, R – inicijalno opterećenje papira, μ – viskoznost fluida, D – koeficijent difuzije definiran kao $\frac{\kappa \Delta p}{\mu}$. Na ovaj način podešavanjem geometrije papira i hidrofobnih barijera možemo optimirati protok fluida kroz papir [5].

Močenje papira ovisiti će o kontaktnom kutu ϑ te širini kanalića kroz koje prolazi fluid te je opisano navedenim izrazom:

$$l(t) = k \sqrt{\left(1 + \beta \frac{d}{\phi^{1/3} w} \frac{\cos(\vartheta b)}{\cos \vartheta}\right) \frac{\sigma}{\mu} t}$$

gdje je $l(t)$ – duljina fronte, k i β – eksperimentalno određene konstante, d – promjer pora papira, φ – poroznost papira, θ_b – kontaktni kut na granici faza, θ – kontaktni kut između fluida i vlakna papira, σ – površinska napetost, μ – viskoznost fluida, t – vrijeme [5].

Hidrofobne barijere na papiru će činiti paralelno postavljene kapilare između kojih je kontaktni kut θ te kako ne bi došlo prelaska fluida preko njih i močenje papira bi bilo sporije kontaktni kut θ mora biti $>90^\circ$ [5].

Na brzinu močenja papira značajan utjecaj ima temperatura te orijentacija vlakana unutar papira. Porast temperature uzrokuje pad viskoznosti fluida čime će brzina močenja narasti. Ukoliko su vlakna orijentirana paralelno u odnosu na protok fluida kroz papir brzina močenja će rasti. Potpuni uvid u parametre koji utječu na brzinu i protok fluida kroz papir omogućeno nam je optimiranje senzora koji će davati puno preciznije rezultate dijagnostičkih mjerenja [4,5].

1.4. 2-D i 3-D protok fluida kroz papir

S obzirom da je glavni cilj papirnatih senzora njihova globalna dijagnostička primjena, a većina komercijalno dostupnih dijagnostičkih metoda zasniva se na višestrukim slijedovima kemijskih i bioloških reakcija, potrebno je odrediti vrstu protoka koji ćemo asemblirati na sam papirni senzor [1].

Osnovna namjena papirnatih mikrofluidičkih senzora je „jeftina i jednostavna“ dijagnostika čemu u prilog ide ostvarivanje protoka bez vanjske pumpe [1]. Na taj način 2-D protok spaja seriju kanalića i zasniva se na primjeni klasičnih modela transporta fluida. Prema zakonu u očuvanju mase, brzina močenja kanalića je proporcionalna širini kanalića. Što je kanalić širi biti će veća brzina močenja i obratno. Ostvaren protok je lateralni, a serija povezanih kanala u određenim geometrijskim oblicima, određene širine omogućiti će provođenje višestupanjskih reakcija u zadanim vremenskim periodima [5,6].

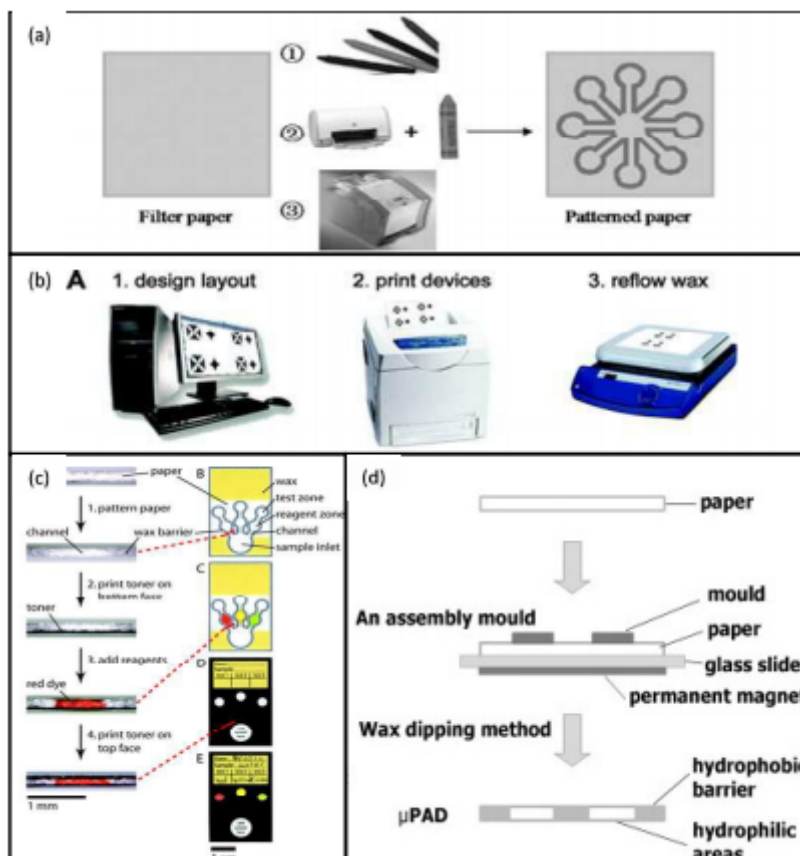
Većina kemijskih i bioloških analiza zahtjeva provođenje reakcija u 3 dimenzije. Sama kompleksnost uzoraka zahtjeva provođenje analiza kod kojega do odvajanja i detekcije analita dolazi tijekom višestupanjskih reakcija. Zbog toga je potrebno osigurati 3 dimenzije senzora kako bi se omogućila impregnacija reagensa, koncentriranje, miješanje, separacija uzorka, itd... U ovu svrhu osmišljeni su 3-D senzori koji nastaju spajanjem papira u više slojeve te njegovim presavijanjem. Na ovakvom senzoru javlja se lateralni protok duž svakog sloja pojedinačno, međutim omogućeno je i ostvarivanje vertikalnog protoka koji je okomit na slojeve [5]. Time je pokriveno široko reakcijsko područje za provođenje analiza, kao i

opseg fluida koji se mogu koristiti prilikom provođenja mjerenja. Najjednostavniji 3-D senzor se može sastojati od nekoliko slojeva papira složenih jedan iznad drugoga i međusobno povezani samoljepljivom trakom sa ili bez određene razmaknice. Kanalići sa hidrofobnim barijerama su poravnati te fluid protječe njima vertikalno iz jednoga u drugi što omogućuje selekciju ispitivanog analita iz uzorka. Savijanjem papira i preklapanjem zona mogu se dobiti puno kompliciraniji senzori koji omogućuju širi spektar analiza. Zbog toga što se više slojeva nalazi na istom papiru reducirano je vrijeme potrebno za njihovu proizvodnju, poravnavanje slojeva je olakšano, a nakon završetka analize moguće je razdvojiti ih i izvršiti analizu svakog sloja zasebno [5,6].

1.5. Izrada hidrofobnih zona na papiru

Nakon odabira dizajna i geometrije senzora i optimizacije samog protoka, potrebno je krenuti u izradu senzora. Prvi korak izrade jest impregnacija hidrofobnih barijera odnosno barijera koje će spriječiti širenje fluida po papiru, ograničiti ga na željeno područje te omogućiti željene slijedove reakcija, razdvajanje analita i u konačnici detekciju [4]. Postoji nekoliko tehnika koje omogućuju formiranje hidrofobnih zona: tretman plazmom, ispis tintnim pisačem (*ink-jet*) i ispis voskom [4,6,8]. Tretman plazmom provodi se u dva koraka. U prvom koraku kemijski modificiramo cijelokupnu površinu papira i vlakana, pri čemu specifični reagensi reagiraju sa hidroksilnim skupinama i prevode ih u hidrofobne. U drugom koraku dolazi selektivnog prevođenja određenih područja u hidrofilne, čiji rezultat je zapravo formiranja hidrofilnih kanalića za kretanje fluida. Za razliku od tretmana plazmom, ispis tintnim pisačem provodi se u samo jednom koraku – površina papira se kemijski modificira nanošenjem polimernih reagensa, a ovisno o dizajnu predloška dobivamo selektivna hidrofilna područja tj. kanaliće koji će omogućiti kretanje fluida [4,8]. Najpoznatija tehnika za realizaciju hidrofobnih zona je printanje voskom [7,8]. Tehnika se provodi u dva koraka. Prvi korak se zasniva na printanju pomoću pisača nalik tintnom pisaču, koji u sebi sadrži toner sačinjen od voska. Vosak se zagrijava i nanosi tankim iglicama na površinu papira pri čemu dobivamo ispis željenog predloška. Međutim, da bi došlo do pune realizacije hidrofobnih zona dobiveni predložak je potrebno zagrijati kako bi se vosak na površini papira rastalio i djelovanjem sila kapilarnosti prodro unutar porozne strukture papira. Na ovaj način dolazi do zatvaranja hidrofobnih barijera i formiranja hidrofilnih kanalića koji će omogućiti kretanje i razdvajanje fluida. Ova tehnika je vrlo jednostavna, brza i efikasna za primjenu te omogućuje produkciju velikog broja senzora u kratkom vremenu [4,6-8]. Iako se provodi u dva koraka, velika prednost tehnike je što papir ne dolazi u kontakt s reagensima, otapalima i različitim

polimerima tijekom proizvodnje, a čak i najmanji tragovi istih mogu potencijalno ugroziti rezultate mjerenja i utjecati na reproducibilnost.



Slika 2. Proces ispisa hidrofobnih barijera voskom pomoću pisača, preuzeto iz [8].

1.6. Metode detekcije signala na papirnatom senzoru

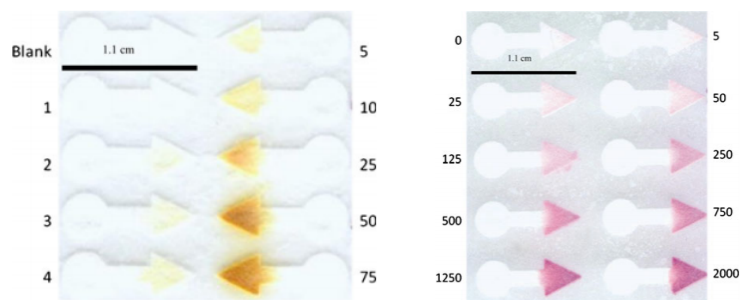
Nakon uspješnog definiranja i optimizacije samog protoka kroz papirni senzor, njegovog dizajna i izrade vrlo je važno odrediti metodu prijenosa signala odnosno pretvornik koji će jedan oblik energije prevesti u drugi i na taj način omogućiti detekciju samoga analita u uzorku. Možemo reći da je odabir metode detekcije presudan za samu dijagnostičku primjenu mikrofluidičkog papirnato senzora jer definira njegov način rada te same granice detekcije analita. Najpoznatije metode detekcije su optičke metode i elektrokemijske metode, koje se međusobno razlikuju po samoj preciznosti određivanja koncentracije analita kao i samim granicama detekcije [1].

Optičke metode temelje se na dobivanju numeričke informacije ovisno o obojenju ili intenzitetu luminiscencije određenog područja detekcije papirnato uređaja. Samo

kvantificiranje signala provodi se pomoću kolorimetrijskog softvera ili primjenom kamere čija je primjena obavezna i neophodna za dobivanje rezultata, a kvantificirani signal predstavlja traženi analit u uzorku. Najpoznatija optička metoda detekcije analita omogućena je kolorimetrijskim prijenosom signala [1,4].

Elektrokemijske metode prednjače u odnosu na optičke jer omogućuju puno preciznije kvalitativne i kvantitativne analize uzoraka zbog puno veće osjetljivosti i selektivnosti samih elektrokemijskih osjetila. Vrijeme odziva je puno brže neovisno o obojenju uzorka. U zoni detekcije provodi se određena elektrokemijska reakcija pri čemu dolazi do generiranja struje ili napona koji se onda mjernim instrumentom određuje kvantitativno. Na rezultat mjerenja utječe odabir radnog potencijala i elektrode. Sam elektrokemijski sustav elektroda sastoji se od radne elektrode, pomoćne i referentne elektrode. Za izradu radne elektrode koriste se različiti materijali za koje je karakteristično da su elektrokemijski inertni za široke raspone potencijala i to su najčešće ugljični materijali ili metali, npr. grafit, grafen, nano kristali ugljika ili zlato. Referentna elektroda je najčešće izrađena od srebra, odnosno koristi se kombinacija srebro/srebrov klorid. Sama implementacija elektrokemijskog sustava elektroda na papirnati senzor je vrlo jednostavna – crtanje običnim grafitnim olovkama te nanošenje boje sa česticama srebra. Ovim postupkom se izbjegava skupa tiskarska oprema, a i sam postupak implementacije je pojednostavljen. Sustavi detekcije u kod elektrokemijskih papirnatih senzora baziraju se na primjeni amperometrije, voltometrije i potenciometrije [1,4,6].

Većina mikrofluidičkih papirnatih senzora zasniva se na kolorimetriji. Na tržištu postoje različiti reagensi koji su usko vezani uz različite analite koji omogućuju detekciju golim okom – tj. detekciju promjene boje i/ili intenziteta boje koji se dovodi u direktni odnos sa koncentracijom ispitivanog analita u uzorku [1,4]. Međutim, samu detekciju moguće je provoditi golim okom, ali se u novije vrijeme koriste različiti optički čitači i u smartphone-ovi koji omogućuju puno precizniju detekciju i u konačnici samu kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka [1]. Kao analit se mogu detektirati različiti ioni, male molekule, veće biomolekule i polimeri te bakterijske stanice. Kolorimetrijski prijenos signala je relativno brz, a detekcija je jednostavna i jeftina te se idealno uklapa u cijeli koncept i filozofiju samih mikrofluidičkih papirnatih senzora koji moraju biti jednostavni i brzi za upotrebu, jeftini i dostupni te za jednokratnu upotrebu [1,4].



Slika 3. Papirnati mikrofluidički senzor za kolorimetrijsku detekciju glukoze i nitrata, preuzeto iz [9].

Fluorescencijski prijenos signala vrši se pomoću fluorometra. Sama fluorescencija jest luminiscencija kod koje pobuđivanje signala tj. dolazi do zračenja svjetlosti određene valne duljine za vrijeme osvjetljivanja te je karakteristična za svaku pojedinu kemijsku tvar te je pokazuju samo određeni materijali. Kod ovakvih detektora važno je eliminirati vanjske čimbenike, kao što su ambijentalno svjetlo ili sama matrica uzorka, koji bi mogli utjecati na odziv. Najveći nedostatak metode je taj što u odnosu na kolorimetrijsku metodu iziskuje izvor svjetlosti tj. pobude signala. Uvođenje same svjetlosti, unatoč korištenju optičkih filtera i promjenom kuta fotodetektora, povećava pozadinski šum i remeti same rezultate mjerenja i detekcije. Također, u papir se znaju dodavati različita sredstva i kemikalije za posvjetljivanje ili prilikom impregnacije hidrofobnih zona, čime može doći do njihovog interferiranja tijekom provođenja mjerenja. Kako bi se ovo izbjeglo, a rezultati bili što precizniji, preporuča se korištenje običnog filter papira ili papira za kromatografiju. Ovaj papir je po sastavu sačinjen od 100% celuloze te je minimalno tretiran kemikalijama čime će i rezultati biti precizniji i točniji [1].

Kemiluminescencijski prijenos signala temelji se na detekciji pojave svojstva kemiluminescencije. To je vrsta luminiscencije koja je vezana uz kemijske promjene u nekim tvarima. Pri kemiluminescenciji emitira se energija koja je oslobođena u određenoj egzotermnoj kemijskoj reakciji, najčešće oksidaciji. U usporedbi s fluorescencijom, nema potrebe za vanjskim izvorom svjetlosti kako bi došlo do pobude signala čime se eliminira i mogućnost pojave pozadinskih šumova te se povećava preciznost metode. Emisija kemiluminescencije započinje u trenutku kada sve reakcijske komponente dolaze u kontakt te je trajanje ograničeno ovisno o koncentraciji samih reakcijskih komponenata. Detekcija se vrši pomoću čitača ili kamere, koji se ubrajaju pod sofisticiranije uređaje čija početna investicija podrazumijeva visoki trošak, a sama nemogućnost prenošenja ograničava ovakve

senzore na laboratorijsku primjenu, što se ne uklapa u moto mikrofluidičkih papirnatih senzora koji bi se trebali moći koristiti na samom licu mjesta i biti prenosivi [1,4].

Elektrokemiluminescencijski prijenos signala primjenjuje svojstvo elektrokemiluminescencije, pri čemu uzrok pojave luminescencije jest primjena napona koji elektrokemijski inducira pobuđeno stanje određenog kemijskog spoja. Korištenje elektrokemiluminescencije kombinira korištenje kemiluminescencije i elektrokemije, pri čemu nema svjetlosne pobude čime je eliminiran pozadinski šum. Detekcija je omogućena kamerom "pametnog" prijenosnog telefona (*smartphone*) pa je ova metoda dostupna i jeftina, međutim primjena je još uvijek ograničena [1,4].

Također, razvijeni su i senzori koji kod detekcije analita primjenjuju svojstva transmisije i refleksije [1].

Jedna od najvažnijih elektroanalitičkih metoda je svakako amperometrija, koja se bazira na određivanju jakosti struje dobivene oksidacijom ili redukcijom analita, kada na radnu elektrodu primjenjujemo konstantni potencijal. Izmjerena struja je proporcionalna koncentraciji analita u uzorku. Kod implementacije elektroda u papirnati senzor razlikujemo dva tipa senzora: integrirani i kombinacijski tip. Kod integriranog tipa elektrode su izrađene i ugrađene u papirnati nosač, dok kod kombinacijskog tipa koristi se vanjski set elektroda. Kao glavni nedostatak metode je nedostatak selektivnosti jer određene male molekule i metaboliti mogu interferirati rezultate mjerenja. Također, molekule nečistoća mogu adsorbirati na površinu radne elektrode što će također interferirati rezultate mjerenja i promijeniti karakterističan odziv elektrode [1, 4].

Senzori koji se temelje na voltametrijskoj detekciji baziraju se mjerenju struje, prilikom provođenja određene elektrokemijske reakcije, dok se potencijal na radnu elektrodu varira. Rezultati mjerenja dovode se u vezu sa koncentracijom ispitivanog analita. Signal odnosno odziv senzora može se poboljšati povećanjem površine i vodljivosti radne elektrode. Ovi senzori pronalaze svoju primjenu u ispitivanju i detekciji teških metala, a često se kombiniraju i sa kolorimetrijskim metodama detekcije [1,4].

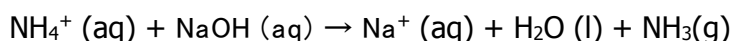
Potenciometrijski elektrokemijski senzori baziraju se na primjeni potenciometrije i mjerenja razlike potencijala između radne i referentne elektrode u otopini uzorka. Selektivnost samih elektroda može se poboljšati prevlačenjem preko površine elektrode ion selektivne membrane. Takva ion selektivna elektroda i referentna elektroda mogu se koristiti više puta, a zbog svoje jednostavnosti, prilagodljivosti i niske cijene metoda ušli u široku primjenu [1,4].



Slika 4. Standardni senzor za određivanje glukoze u krvi temeljen na primjeni papirnatih mikrofluidike i elektrokemijske detekcije, preuzeto iz [10].

1.7. Primjeri izvedbe papirnatih mikrofluidičkih senzora

Papirnatih mikrofluidički senzor za detekciju amonijaka u otpadnim vodama temelji se na plinskoj difuziji amonijaka te omogućuje njegovu kolorimetrijsku detekciju [11-13]. Sam senzor sastoji se od više slojeva međusobno povezanih samoljepljivom trakom. Sloj za nanošenje uzorka sadrži otvor za nanošenje uzorka na uređaj. Nakon što se uzorak nanese, dolazi do širenja po površini papira na koji je prethodno impregniran reagens - natrijev hidroksid. Amonijev ion iz uzorka otpadne vode u prisutnosti natrijevog hidroksida prelazi do plinovitog amonijaka.



Nastali amonijak prolazi kroz barijeru - određeni zračni prostor, koji se nalazi između zone reakcije i zone detekcije te služi isključivo za nakupljanje plina i njegovo usmjeravanje do zone detekcije. Prolaskom amonijaka do sloja za detekciju na koji je impregniran određeni kiselinsko-bazni indikator – fenolftalein, dolazi do pojave ružičasto-ljubičastog obojenja te je omogućena kolorimetrijska detekcija amonijaka. Kao kolorimetrijski indikator mogu se koristiti i 3-nitrofenol koji će u prisutnosti amonijaka iz obezbojenog preći u žuto obojenje te bromtiol plavo koje u prisutnosti amonijaka prelazi iz žutoga u plavo obojenje. Promjena obojenja određuje kvalitativno prisutnost amonijaka, međutim povezivanjem ovakvog uređaja sa skenerom ili upotrebom kamere "pametnog" (*smartphone*) telefona omogućen je prijenos kolorimetrijskog signala u određene kompjutorske programe za kolorimetrijsku obradu, čime je ovisno o promjeni intenziteta obojenja omogućena i kvantitativna detekcija amonijaka, a što je intenzitet obojenja jači koncentracija amonijaka biti će veća.

Karakteristične granice detekcije ovakvog uređaja su $0,8 - 1,8 \text{ mg N L}^{-1}$, a reproducibilnost mjerenja se kreće u rasponu od 3.1 do 3.7 % ($n \geq 10$, 20 mg N L^{-1}) izraženo kao relativna standardna devijacija [11].

Postoji i vrlo sličan uređaj za detekciju otopljenog ugljikovog dioksida u uzorku vode [14]. Nakon nanošenja uzorka ugljikov dioksid prolazi kroz membranu do područja detekcije s nanesenim pH indikatorom – bromtiol plavo, timol plavo i sl. Dolazi do promjene obojenja ovisno o koncentraciji ugljikovog dioksida u uzorku te se mjeri apsorbancija. Granice detekcije ovih uređaja je 7.2 ppm [14].

Korištenjem plinske difuzije osmišljen je i uređaj za detekciju sulfita pomoću Ramanove spektroskopije. Područje linearnosti detekcije sulfita ovom metodom kreće se od 5 do 300 $\mu\text{g/mL}$, a granica detekcije je čak 2 $\mu\text{g/mL}$ [15].

2. Materijali i metode

2.1. Materijali

Za pripremu otopina korištene su sljedeće krutine: trikloroctena kiselina, kalijev nitrat, kalijev heksacijanoferat(III), natrijev sulfit, natrijev tetraborat dekahidrat, natrijev hidrogenfosfat i natrijev dihidrogenfosfat. Sve kemikalije su bile p.a. čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. Sve otopine pripremane su neposredno prije korištenja, koristeći dvostruko deioniziranu vodu. Fosfatni pufer ukupne koncentracije fosfata od 0,1 mol/L pripremljen je dodavanjem otopine natrijeva hidrogenfosfata ($c = 0,1$ mol/L) u otopinu natrijeva dihidrogenfosfata ($c = 0,1$ mol/L) do postizanja pH 6,0. Kao boratni pufer (pH = 9,2) korištena je otopina natrijeva tetraborata koncentracije 0,1 mol/L.

Za izradu papirnatih mikrofluidičkih platforma korišten je kvalitativni filterski papir Whatman Grade 1 (Whatman, USA), minimalnog sadržaja α -celuloze od 98 % i srednje poroznosti (nominalni promjer pora, 11 μ m). Za izradu trodimenzijskih struktura na mikrofluidičkim platformama korištena je dvostruko ljepljiva traka proizvođača Tesa, debljine 0,07 mm. Za izradu elektroda korištena je grafitna olovka tvrdoće 6B, proizvođača TOZ Penkala (Hrvatska) te električno vodljivi lak na bazi srebra, proizvođača ChemTech (Njemačka).

2.2. Instrumentacija

Za izradu papirnatih mikrofluidičkih platformi korišten je pisač Xerox ColorCube 8570 (Xerox, USA), koji za ispis koristi čvrste tinte na bazi voska. Za elektrokemijska mjerenja korišten je potencijostat Iskra MA 4200 (Iskra, Slovenija), povezan s računalom i konfiguriran za dvoelektrodno mjerenje.

2.3. Metode

2.3.1. Dizajn i izrada papirnatih mikrofluidičkih platformi

Mikrofluidički senzori željenog rasporeda elemenata i duljine mikrofluidičkog kanala nacrtani su u vektorskom programu CorelDRAW® i ispisani tintom na bazi voska na filterskom papiru. Filterski papir je potom u sušioniku zagrijan na 120 °C tijekom 2 minute kako bi se

vosak otopio, prodrio u pore papira, jednoliko ih ispunio i formirao hidrofobne barijere koje će ograničiti kretanje elektrolita i uzorka po papiru. Grafitne elektrode su načinjene crtanjem pravokutnika dimenzija 2 x 10 mm mekom grafitnom olovkom, okomito na profil mikrofluidičkog kanala, s obje strane papira. Kako bi se olakšalo crtanje elektroda definirane površine i osiguralo da su elektrode s obje strane papira smještene točno jedna iznad druge, za crtanje elektroda poslužilo se plastičnom šablonom izrađenom od poliesterske folije. Na rubove grafitnih elektroda u konačnici je nanešen sloj vodljivog laka na bazi srebra kako bi se dobio robustan i izdržljiv kontakt s grafitnim elektrodama.

Element za nanošenje uzorka izrađen je u obliku papirnatog kruga promjera 5 mm čiji je rub ograničen hidrofobnom barijerom od voska. Na unutarnji dio kruga nanešena je otopina trikloroctene kiseline u vodi (maseni omjer vode i trikloroctene kiseline, 1:1) i ostavljena da se osuši. Nakon sušenja, element za nanošenje uzorka fiksiran je na mikrofluidički senzor pomoću prstena izrađenog od dvostruko ljepljive trake, vanjskog promjera 5 mm i unutarnjeg promjera 3 mm.

Donja površina mikrofluidičkog senzora izolirana je od kontakta s podlogom na koju je tijekom mjerenja postavljen senzor pomoću samoljepljive trake ("selotejpa").

2.3.2. Izvedba mjerenja

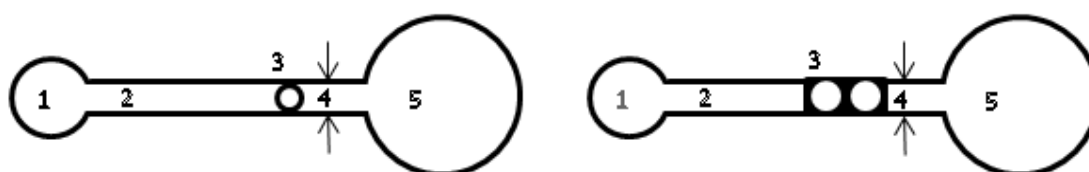
Za potrebe mjerenja, kontakti na elektrodama spojeni su na potencijostat konfiguriran za dvoelektrodno mjerenje i na njih je narinuta razlika potencijala od 250 mV. Na segment senzora koji je funkcionirao kao spremnik elektrolita pipetom je nanešen volumen od 100 μL osnovnog elektrolita (10 mM otopina $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ u 0,1 M KNO_3) i senzor je ostavljen nekoliko minuta da se ustabili protok elektrolita kroz mikrofluidički kanal. Nakon uspostave stacionarnog protoka, koji se manifestira stabiliziranjem male ($<1 \mu\text{A}$) struje između elektroda, na segment za nanošenje uzorka mikropipetom je dodano točno 1,0 μL uzorka i bilježena je promjena struje u vremenu.

3. Rezultati i rasprava

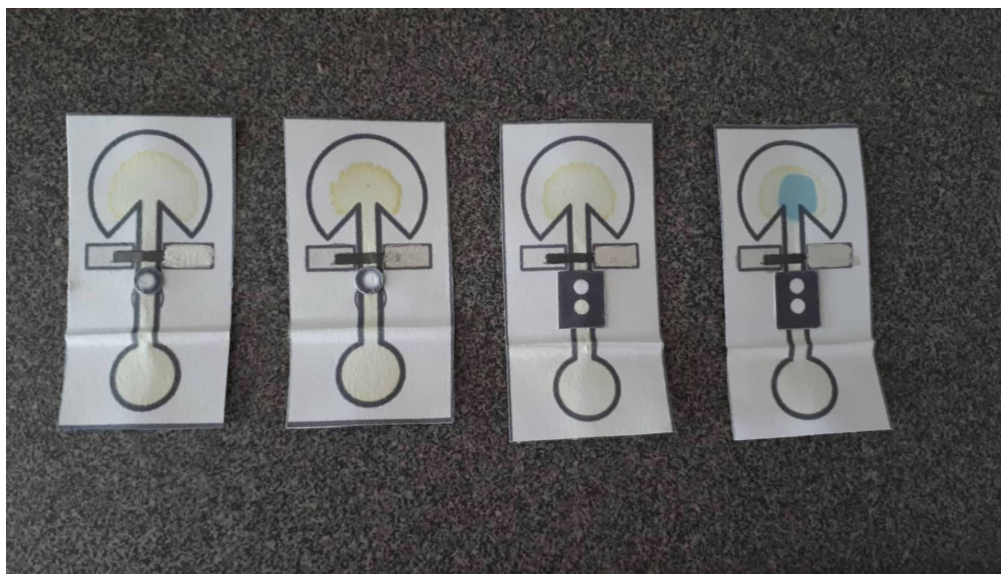
3.1. Dizajn i princip rada mikrofluidičkog senzora

Za izradu mikrofluidičkog senzora korišten je kvalitativni filterski papir Whatman Grade 1 (Whatman, USA). On je lako dostupan i jeftin te ne sadrži druge tvari (npr. punila) osim celuloze, što eliminira mogućnost interferiranja nečistoća iz papira prilikom mjerenja. Također, fluidička svojstva filterskog papira su dobro definirana jer se određena gradacija papira proizvodi s relativno uskom i tvornički zajamčenom raspodjelom veličina pora, odn. poroznošću.

Izrađeni mikrofluidički senzor shematski je prikazan na slici 5. Senzor je dizajniran u linearnoj konfiguraciji i sastoji se od mikrofluidičkog kanala (2) širine 3 mm i duljine 50 mm, na čijem se jednom kraju nalazi kružni element ($d = 8$ mm) koji služi kao spremnik osnovnog elektrolita (1), a na drugom kraju veći kružni element ($d = 20$ mm), koji služi kao za prihvata elektrolita (5). Nanošenjem volumena elektrolita koji je veći od volumena potrebnog za potpuno močenje papira u spremniku elektrolita ostvaruje se tok elektrolita od spremnika (1) prema spremniku (5). Neposredno ispred spremnika (5), okomito na mikrofluidički kanal, smještene su grafitne elektrode (4). Ispred elektroda smještena je difuzijska ćelija (3), koju čine papirnati disk za nanošenje uzorka, promjera 5 mm, impregniran triklorooctenom kiselinom i zalijepljen iznad mikrofluidičkog kanala pomoću dvostrukoljepljive trake u obliku prstena s unutarnjim otvorom promjera 3 mm. Na taj je način između diska za nanošenje uzorka i mikrofluidičkog kanala stvoren zračni prostor definiran debljinom dvostruko ljepljive trake (0,11 mm), koji omogućuje difuziju plinovitog analita s diska za nanošenje uzorka u elektrolit koji struji mikrofluidičkim kanalom. Stvarni izgled izrađenog mikrofluidičkog senzora prikan je na slici 6.



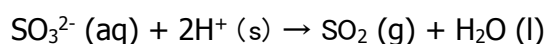
Slika 5. Shematski prikaz dizajniranog papirnatog mikrofluidičkog senzora. 1 – rezervoar osnovnog elektrolita, 2 – mikrofluidički kanal, 3 – difuzijska ćelija (s jednim ili dva elementa za nanošenje uzorka), 4 – elektrode, 5 – rezervoar za prihvat elektrolita.



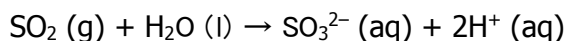
Slika 6. Papirnati mikrofluidički senzori za detekciju sulfita s jednim (prva dva senzora s lijeve strane slike) ili dva elementa za nanošenje uzorka.

Potrebno je istaknuti da je specifičnost dizajna oblik elementa za prihvrat toka elektrolita, koji je izrađen u obliku kružnog segmenta s kutem od 270° . Taj kružni segment osigurava ravnomjernost i stabilizaciju protoka duž mikrofluidičkog kanala. Naime, što je duljina mikrofluidičkog kanala ispunjenog fluidom veća, to protok fluida više opada jer je otpor strujanju veći. U trenutku kad tekućina koja struji kroz mikrofluidički kanal dođe do kružnog segmenta, fronta strujanja se zakrivljuje (slika 6), uslijed čega se povećava perimetar tekućine i ona moći veći broj pora papira. S obzirom da je kapilarni tok kroz pore papira pokretačka sila mikrofluidičkog transporta tekućine po papiru, povećanje pokretačke sile uslijed povećanja perimetra (fronte) tekućine upravo kompenzira porast otpora strujanju tekućine zbog produljenja puta, što u konačnici dovodi do stabilizacije protoka na relativno konstantnu vrijednost.

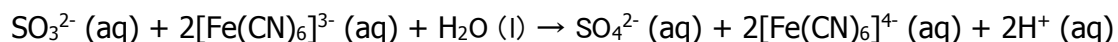
Dodavanjem uzorka na element za nanošenje uzorka dolazi do otapanja trikloroetene kiseline kojom je impregniran element i uzorak se zakiseljava. S obzirom da je trikloroetena kiselina srednje jaka ($pK_a = 0,66$) postiže se pH uzorka od otprilike 2. Pri toj vrijednosti pH sulfit iz uzorka se u potpunosti protonira i prelazi u plinoviti sumporov(IV) oksid:



Oslobođeni SO_2 difuzijom kroz zračni procijep između elementa za nanošenje uzorka i mikrofluidičkog kanala dolazi u kontakt s elektrolitom koji struji kroz kanal i otapa se u njemu dajući ponovo sulfat:



Nakon što otopina elektrolita s otopljenim sulfitom dođe do elektroda, na jednoj elektrodi (anodi) dolazi do oksidacije sulfita u sulfat, dok će na drugoj elektrodi (katodi) doći do redukcije fericijanida u ferocijanid. Sumarnu elektrokemijsku reakciju opisuje jednažba:



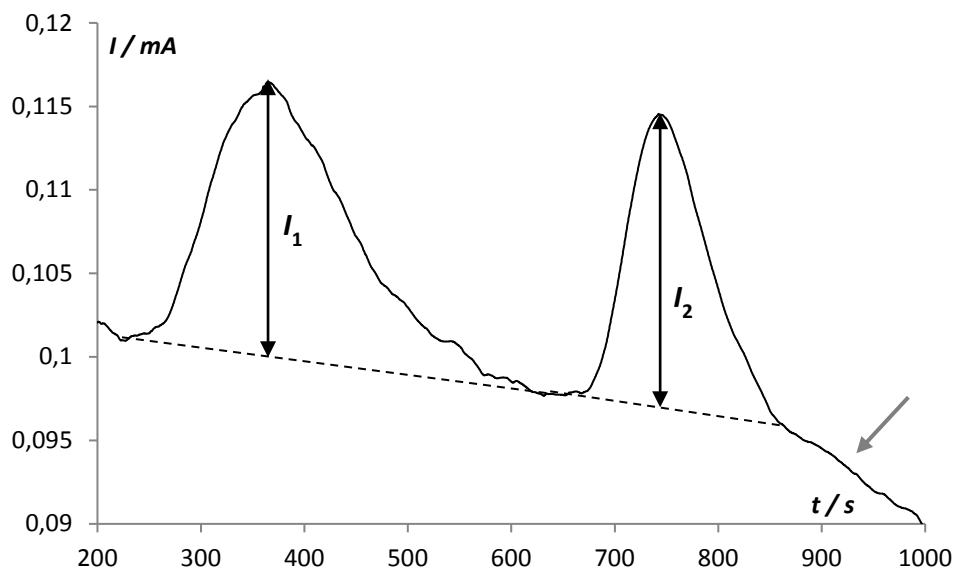
Pritom je struja koja teče između elektroda, s obzirom da se ferocijanid nalazi u velikom suvišku u odnosu na sulfit, određena upravo koncentracijom sulfita u elektrolitu, koja je pak proporcionalna koncentraciji sulfita u uzorku.

3.2. Testiranje mikrofluidičkog senzora

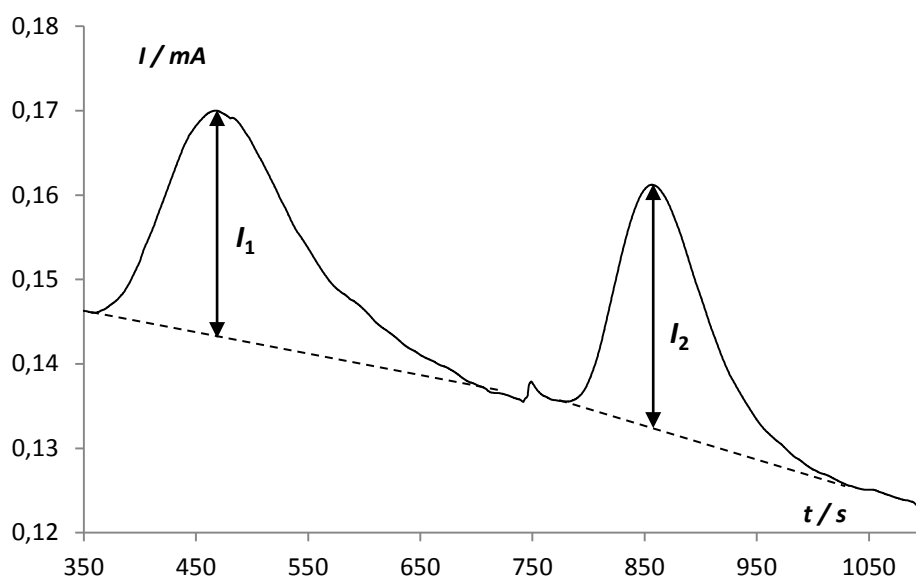
Provedena su mjerenja s ciljem provjere prethodno opisanog principa rada osmišljenog papirnatog mikrofluidičkog senzora. Prva serija mjerenja obuhvaćala je eksperimente provedene s ciljem utvrđivanja kako pH elektrolita koji struji kroz mikrofluidički kanal utječe na signal sulfita. Naime, s obzirom da se SO_2 oslobođen iz uzorka bolje otapa u lužnatom mediju, pretpostavljeno je da će povećanje pH elektrolita doprinosti povećanju strujnog odziva senzora. Mjerenja su izvedena s jednostavnijim dizajnom senzora, koji je sadržavao difuzijsku ćeliju sa samo jednim elementom za nanošenje uzorka (slika 6, senzori lijevo). Rezultati mjerenja provedeni s elektrolitom koji je sadržavao 10 mmol/L kalijeva ferocijanida i 0,1 mol/L natrijeva nitrata u fosfatnom puferu (pH 6,0) i boratnom puferu (pH 9,2) prikazani su na slikama 7 i 8. Pri pH elektrolita od 6,0 strujni odziv senzora na dvokratni dodatak po 1 μL otopine sulfita, koncentracije $\gamma(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 200 \text{ mg/L}$, iznosio je 17,4 i 17,1 μA (slika 7). Povećanjem pH elektrolita na 9,2 strujni odziv senzora povećao se na 27,2 i 28,7 μA (slika 8). Dobiveni rezultati ukazuju na porast strujnog odziva senzora s povećanjem pH elektrolita, u skladu su s ranije spomenutim očekivanjima, stoga je u svim daljnjim mjerenjima korišten osnovni elektrolit puferiran boratnim puferom na vrijednost pH od 9,2.

Testirana je i reproducibilnost mjerenja s konstruiranim senzorom. Strujni odziv senzora prilikom trokратnog dodatka standardne otopine sulfita prikazan je na slici 9. Visine izmjerenih strujnih maksimuma iznosile su između 10,1 i 13,7 μA , pri čemu je srednja vrijednost triju mjerenja iznosila $11,9 \pm 1,8 \mu\text{A}$, odnosno relativno, $11,9 \mu\text{A} \pm 15 \%$. S

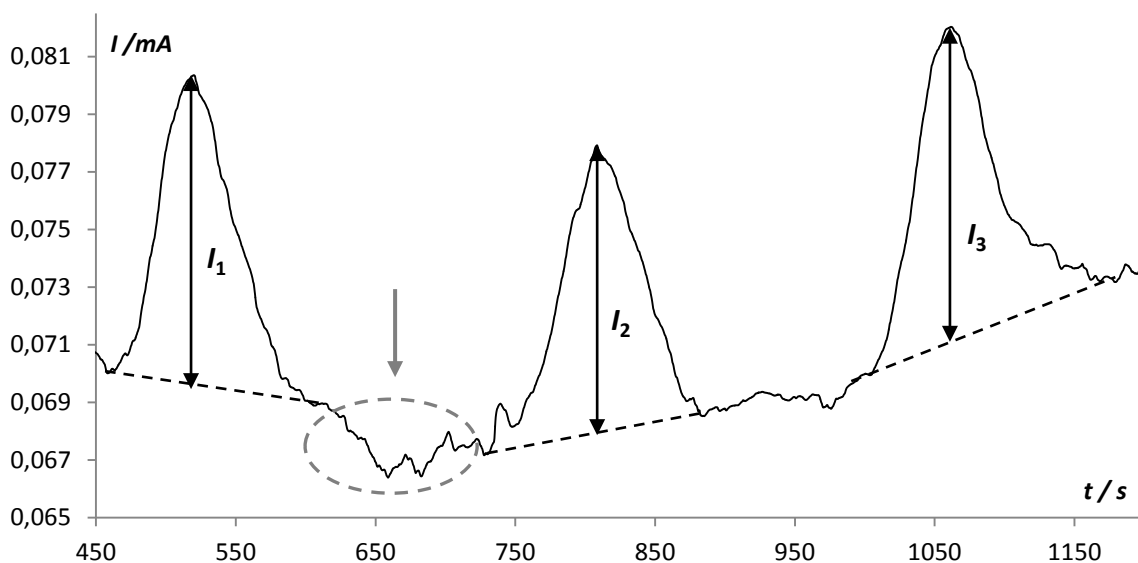
obzirom na jednostavnost izvedbe senzora, reproducibilnost mjerenja od 15 % može se smatrati vrlo zadovoljavajućom.



Slika 7. Strujni odziv senzora prilikom dvokratnog dodatka standarda sulfita ($\chi(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 200 \text{ mg/L}$) pri pH osnovnog elektrolita od 6,0.



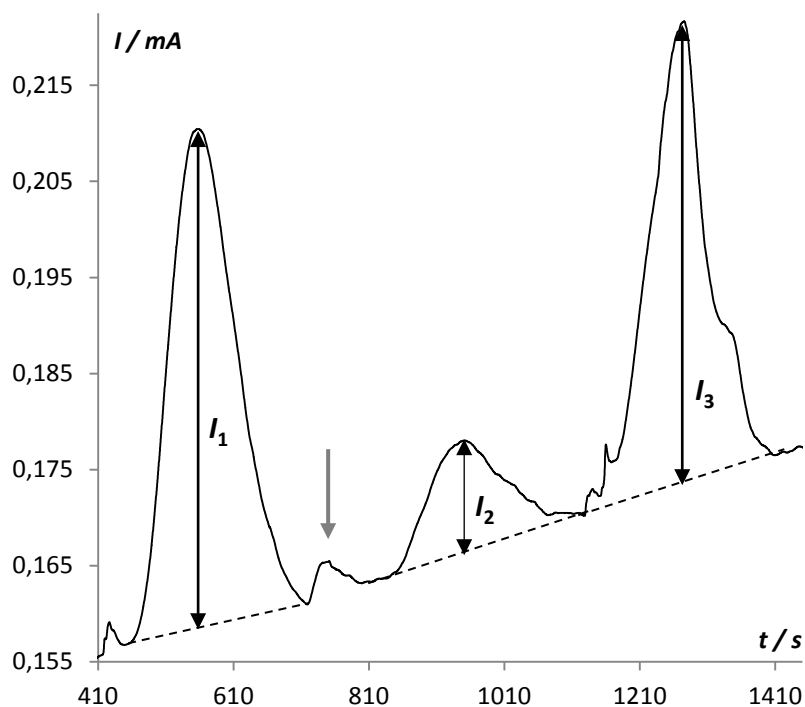
Slika 8. Strujni odziv senzora prilikom dvokratnog dodatka standarda sulfita ($\chi(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 200 \text{ mg/L}$) pri pH osnovnog elektrolita od 9,2.



Slika 9. Strujni odziv senzora prilikom trokratnog dodatka standarda sulfita, pri pH osnovnog elektrolita od 9,2.

Prilikom opisanih eksperimenata uočen je nedostatak dizajna senzora s jednim elementom za dodavanje uzorka. Naime, prilikom višekratnog dodavanja uzorka na uzorkom prethodno već namočen element, primijećeno je da se papir elementa značajno deformira. Time se mijenja debljina zračnog procjepa između elementa za nanošenje uzorka i mikrofluidičkog kanala, zbog čega se mijenjaju i uvjeti difuzijskog transporta SO_2 do elektrolita koji struji mikrofluidičkim kanalom. To nužno utječe na strujni odziv senzora, što je i primjećeno prilikom mjerenja sa senzorom. Naime, reproducibilnost mjerenja u kojima je došlo do zamjetne deformacije elementa za nanošenje uzorka bila je značajno manja od prethodno spomenutih 15 %, postignutih uz vrlo pažljivo nanošenje uzorka na senzor.

Navedeni nedostatak pokušalo se riješiti izvedbom senzora s difuzijskom ćelijom s dva segmenta za dodavanje uzorka (slika 6, desni senzori). Takvim se dizajnom željelo omogućiti i mjerenje metodom standardnog dodatka, pri čemu bi se na jedan element dodavao uzorak, a na drugi element otopina standarda, čime bi se povećala reproducibilnost i točnost mjerenja. Međutim, rezultati mjerenja dobiveni senzorom s dvostrukim elementom za dodavanje uzorka vrlo su neobični – nanošenjem standarda iste koncentracije na oba elementa dobiveni su osjetno različiti strujni odzivi. Tipičan odziv senzora prikazan je na slici 10, iz koje se vidi da je razlika u strujnim odzivima veća od 4,5 puta. Slično ponašanje dobiveno je na svim testiranim senzorima s dvostrukim elementom za nanošenje uzorka i u okviru eksperimenata provedenih u ovom radu nije ga se uspjelo zadovoljavajuće objasniti.



Slika 10. Strujni odziv senzora prilikom dvokratnog dodatka standarda sulfita ($\gamma(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 300 \text{ mg/L}$) na prvi element za dodavanje uzorka (odzivi I_1 i I_3) te drugi element za dodavanje uzorka (odziv I_2).

Osim navedenog efekta, primijećeno je još nekoliko nepoželjnih efekata koje je potrebno ukloniti ili umanjiti u daljnjem razvoju senzora. Kako je vidljivo sa slika 7–10, osnovna struja u gotovo svim mjerenjima s vremenom se mijenja, što dovodi do pojave nagiba bazne linije od koje se mjeri visina strujnih maksimuma. To otežava jednostavno određivanje maksimalne struje jer zahtjeva dodatnu obradu izmjerene signala. Dodatno se obrada komplicira činjenicom da je u nekim mjerenjima primijećena nagla promjena nagiba osnovne struje (slika 7, označeno sivom strelicom). U nekim mjernjima uočene su značajne oscilacije osnovne struje, koje ako se dogode tijekom mjerenja signala uzorka, za rezultat imaju neupotrebljivo mjerenje, a ako se dogode između dodataka uzorka, otežavaju određivanje baze strujnog maksimuma (slika 9, označeno sivom strelicom). U nekim slučajevima zabilježena je pojava "lažnih" strujnih maksimuma, uzrokovanih doticanjem elementa za dodavanje uzorka vrškom mikropipete. Ako su takvi "lažni" maksimumi izraženi, kao primjerice na slici 10, mogu dovesti do zabune kod mjerenja uzoraka s malom koncentracijom sulfita, zbog nerazlikovanja "lažnog" maksimuma od maksimuma uzorka.

4. Zaključak

Na temelju istraživanja provedenih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Biamperometrija se može s uspjehom primijeniti za detekciju i kvantifikaciju elektroaktivnih analita u papirnatim mikrofluidičkim senzorima, kako je pokazano na primjeru senzora za određivanje sulfita, temeljenog na prevođenju sulfita u plinoviti SO_2 , njegovom difuzijskom transportu u elektrolit koji sadrži elektroaktivnu vrstu – fericijanid, te biamperometrijskoj detekciji para fericijanid/sulfit.
2. Zbog uporabe papira kao osnovnog materijala senzora, izrade senzora tehnikom ispisa na papiru, izrade elektroda crtanjem grafitnom olovkom te iskorištavanja mikrofluidičkog transporta tekućine kroz papir za ostvarivanje toka reagensa po senzoru, konstruirani senzor je jeftin i stoga prikladan za masovnu proizvodnju. Zbog vrlo male potrošnje reagensa i uzorka razvijeni senzor je ekološki prihvatljiv.
3. U daljnjem razvoju senzora potrebno je riješiti probleme vezane uz promjenjivu osnovnu struju i poboljšati reproducibilnost mjerenja unaprijeđivanjem dizajna senzora i omogućavanjem provedbe mjerenja metodom standardnog dodatka. Rješavanjem navedenih problema značajno će se pojednostaviti mjerenje s razvijenim senzorom te se svesti na dodavanje elektrolita i uzorka na za to predviđene elemente senzora. Time bi se omogućilo da mjerenje mogu izvoditi i needucirani korisnici, čime se otvara put masovnoj uporabi ovakvog tipa senzora u svakodnevnom životu.

5. Literatura

1. Ruecha N., Yamada K., Suzuki K., Citterio D., (Bio)Chemical Sensors Based on Paper, u: Cesar Paixão T., Reddy S. (eds), *Materials for Chemical Sensing*, Springer, 2017., str. 29-74. (2017)
2. Hrvatska Enciklopedija, <<http://www.enciklopedija.hr>>, pristupljeno kolovoz 2018.
3. Yamada K., Henares TG., Suzuki K., Citterio D., Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 5294-5310
4. Snober A., Minh-Phuong NB., Abdenmour A., Paper-based chemical and biological sensors: Engineering aspects, *Biosensors and Bioelectronics* 77 (2016) 249-263
5. Gong M., Sinton D., Turning the Page: Advancing Paper-Based Microfluidics for Broad Diagnostic Application, *Chem. Rev.* 117 (2017) 8447–8480
6. Jiang X., Fan H. Z., Fabrication and Operation of Paper-Based Analytical Devices, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 9 (2016) 14.1-14.20
7. Carrilho E., Martinez A. W., Whitesides G. M., Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7091-7095
8. He Y., Wu Y., Fu J.-Z., & Wu W. B., Fabrication of paper-based microfluidic analysis devices: a review, *RSC Advances* 5 (2015) 78109–78127
9. Klasner S. A., Price A. K., Hoeman K. W., Wilson R. S., Bell K. J., Culbertson C. T., Paper-based microfluidic devices for analysis of clinically relevant analytes present in urine and saliva, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1821
10. Medical gallery of Blausen (2014), <<http://www.blausen.com>>, pristupljeno kolovoz 2018.
11. Jayawardane B. M., McKelvie I. D., Kolev S. D., Development of a Gas-Diffusion Microfluidic Paper-Based Analytical Device (μ PAD) for the Determination of Ammonia in Wastewater Samples, *Anal. Chem.* 87 (2015) 4621–4626
12. Yeong B. C., Seung H. J., Hyunghil C., Yong S. K., Selective colorimetric detection of dissolved ammonia in water via modified Berthelot's reaction on porous paper, *Sensors and Actuators B: Chemical* 256 (2018) 167-175
13. Phansi P., Sumantakul S., Wongpakdee T., Fukana N., Ratanawimarnwong N., Sitanurak J., Nacapracha D., Membraneless Gas-Separation Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Direct Quantitation of Volatile and Nonvolatile Compounds, *Anal. Chem.* 88 (2016) 8749-56
14. Perez de Vargas Sansalvadora I. M., Lopez Ruiz N., Erenas M.M., Capitan Vallvey L. F., Coleman S., Diamond D., Fernandez Ramosa M. D., Towards an autonomous

- microfluidic sensor for dissolved carbon dioxide determination, *Microchem. Jour.* 139 (2018) 216-221
15. Chen M., Yang H., Rong L., Chen X., A gas-diffusion microfluidic paper-based analytical device (μ PAD) coupled with portable surface-enhanced Raman scattering (SERS): facile determination of sulphite in wines, *Analyst* 141 (2016) 5511-5519
16. E-brojevi, < https://e-brojevi.udd.hr/e_brojevi.htm>, pristupljeno kolovoz 2018

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Valentina Čabula